

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16574

研究課題名(和文) イメージする脳のイメージング：記憶の想起と大脳皮質興奮性・抑制性ニューロンの活動

研究課題名(英文) Analysis of neural computation during sequence recognition and prediction in primary visual and auditory cortices.

研究代表者

蝦名 鉄平 (Ebina, Teppei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：30611206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では実際の感覚入力と記憶の想起により誘発されるニューロン集団の活動を比較する事によって、どのような神経活動が「イメージ」を作り出すことに寄与しているのかを明らかにする。これまでに、時空間配列を持った視覚刺激に対する神経活動とその配列パターンを想起する事による神経活動を記録する事を目的として、マウス大脳皮質を対象とした2光子イメージング法を確立した。また、これらのニューロンがどのサブタイプであるか同定するための方法を確立した。現在は、実際に記憶の想起と実際の入力による神経活動を記録し、これらの情報がどのように神経活動としてコードしているのかを明らかにするための研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：Sensory perception often requires recognition and prediction of temporal sequences of sensory inputs. Neural networks processing the perception involves several subtypes of neurons, but little is known on how each subtype encodes the sequences. To answer this, we are developing methods to monitor neural responses in the cerebral cortex of awake mouse and to classify the neurons into either excitatory or inhibitory subtype. By expressing a calcium indicator, GCaMP6f, into several cortical sites, we could monitor the activity of neurons during performance of a behavior task by two-photon calcium imaging. In addition, we found that immunohistochemistry combined with recently reported CUBIC technique could localize the position of a subtype of neurons in a fixed brain area involving the imaging regions. We started to record the neural responses in the visual or auditory cortex during spatiotemporal sequence recognition and prediction, and to identify the subtypes of the neurons.

研究分野：神経生理学、バイオインフォマティクス

キーワード：2光子イメージング 興奮性ニューロン 抑制性ニューロン 想起

1. 研究開始当初の背景

視覚や嗅覚、触覚などの感覚情報はそれぞれを処理する脳の領域へと送られ、さらに高次の領域で記憶や認知に関する神経活動として保存される。脳は感覚情報などの信号をもとに、高次領域に保存されている記憶を再生したり、少し先に見えるであろう光景をイメージする。

脳が何かを思い出すときには、その内容に関連した高次の脳領域とその情報を処理するための領域(例えば、映像であれば視覚野)で神経活動が見られる(Johnson et al, Neuron, 2009; Ramirez et al, Science, 2013)。この時、思い出した記憶の確かさは想起(思い出すこと)による神経活動が実際の入力による神経活動に似ているほど高くなると予想されている(Johnson et al, Neuron, 2009)。しかし、「思い出す」事によってどのようなニューロン集団の活動が誘発されるのか、例えば、想起と実際の入力によって全く同じニューロン集団が活動するのか、それとも一部のニューロンしか活動しないのかはよくわかっていない。また、大脳皮質のニューロンは興奮性ニューロンと抑制性ニューロンに大別されるが、それぞれのニューロンがどのように「思い出された」イメージに反応するのかも明らかでない。

研究開始段階の予備実験として、視覚イメージの想起が個々のニューロンレベルでどのようなシナプス入力を生じるのかを調べた。マウスの V1 では、ある画像を思いださせる事によって実際にその画像を見た時と同様の興奮性シナプス入力が見られる。一方、抑制性シナプス入力については、その大きさが小さくなり、遅延性の入力のみが観測される結果となった。これらの結果は、視覚イメージの想起が、実際にイメージを見たときと同程度の数の興奮性ニューロンを活性化する一方で、ごく一部の抑制性ニューロンしか活性化しない事を示唆している。

2. 研究の目的

これらの予備実験の結果を受けて、本研究では以下の内容について研究を進める事とした。

想起と実際の入力に反応するニューロン集団は一致するのか？
実際の入力に対するニューロン集団の活動と、想起によって誘発された活動を 2 光子励起イメージング法によって記録し、比較する。
予備実験の結果から、特に抑制性ニューロン

については全く異なる活動パターンを示す事が予想されるが、単に活動するニューロンの数が減るだけなのか、それとも全く異なるニューロン集団が活動しているのかを検証する。

抑制性ニューロンのサブタイプによって差が見られるか？

抑制性ニューロンは形態的な特徴や発現するタンパク質の違いによって複数のサブタイプに分類される。それぞれのサブタイプについて 1 の解析を行い、単一のサブタイプの活動のみが想起によって誘発されるのか、それともそのようなバイアスは見られないのかを検証する。

3. 研究の方法

記憶の想起に関連する大脳皮質の神経活動を記録するために、蛍光カルシウムセンサータンパク質 GCaMP6f を神経細胞に導入する。その後、頭部固定下で覚醒状態のマウスに前肢運動またはリッキングによる運動課題を課し、課題実行中のマウス大脳皮質における 2 光子イメージングを行う。

イメージングしたニューロンのサブタイプを同定するために、イメージング領域を含む固定脳標本を作製し、ホールマウント抗体染色法で特定のサブタイプの空間配置を同定する。In vivo および ex vivo における神経細胞の分布、血管の配向を参考にしながら、活動を記録した神経細胞が興奮性、抑制性またはそのサブタイプかどうかを確認する。

記憶の想起および実際の感覚入力に対する神経活動を記録するために、特定の繰り返しシーケンスを持った視覚刺激、または聴覚刺激を提示する。例えば、マウスの眼に、画像 A に次いで画像 B を提示するシーケンス(A → B)を複数回繰り返すと、B の提示を止めても(A → B) V1 のニューロン集団は B の画像が提示された様に活動する(Gavornik, Nat. Neurosci., 2014)。このような応答を想起に対する応答として、この時の一次視覚野または一次聴覚野における神経活動を記録する。

4. 研究成果

想起と実際の入力による大脳皮質ニューロンの活動を比較するために、2 光子イメージング法を覚醒状態のマウス大脳皮質に適用するための実験系を確立した。はじめに、同一のニューロン集団を長期継続的に観察するために、アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝

子導入の最適化を行った。特に、ウイルスの注入量や注入時間を調整し、過剰な遺伝子発現に起因する細胞死などの問題を起こさないようにし、さらに、イメージング期間中に GCaMP6f の蛍光強度が大きく変化しないパラメータを決定した。また、大脳皮質のニューロンは様々なサブタイプに分類されるが、それぞれに GCaMP6f が発現していることを免疫組織化学的な方法を用いて確認した。

本研究では、イメージング対象とした大脳皮質のニューロンがどのようなサブタイプであったかを同定し、それぞれのサブタイプについて、想起と実際の入力に対する応答を解析する事を目的としている。研究開始当初は Cre-loxP 部位特異的組み換え法を利用し、サブタイプ特異的に GCaMP6f を導入する予定であったが、最近、イメージングした領域に存在する多数のニューロンについてそのサブタイプを同定可能な全脳透明化・抗体染色法が発表された事もあり、この方法を用いた実験系の開発を進めた。これまでに、縦 1 mm x 横 1mm x 深さ方向に 2 mm の角柱状の脳領域を透明化し、免疫染色法によって領域内に存在する、抑制性ニューロンのサブタイプの一つであるパルアルブミン陽性細胞が同定できる事を確認した。また、透明化後の脳領域で、イメージング対象としたニューロンの同定に必要な、大まかな血管配向を同定する事が可能である事を確認した。

最後に、覚醒状態のマウス大脳皮質一次視覚野において記憶の想起と実際の入力による視覚応答計測を試みた。イメージングによる視覚応答の計測のためには、視覚刺激に起因するノイズを最小限にするためにイメージング領域の遮光処理が必須となる。本研究でも、タスク実行中のマウス頭部の遮光処理を行ったが、現在使用している頭部固定用金属プレートの形状などの問題があり、完全な遮光を行うことができなかった。そこで現在は、遮光処理が必要なく、また、一次視覚野と同様に想起による応答が記録できると予想される一次聴覚野を対象としたイメージング方法の検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Richa, T., Ide, S., Suzuki, R., Ebina, T. and Kuroda, Y. Fast H-DROP: A thirty times accelerated version of H-DROP for

interactive SVM-based prediction of helical domain linkers. *J. Comput. Aided Mol. Des.* (2017) 31, p237-244.

〔学会発表〕(計 4 件)

Ebina, T., Masamizu, Y., Hirakawa R., Watakabe, A., Ohkura, M., Kobayashi, K., Sasaki, E., Nakai, J., Yamamori, T., and Matsuzaki, M. Marmoset forelimb-movement tasks for two-photon Ca²⁺ imaging of the motor cortex. The 6th annual conference of Japan Society for Marmoset Research, Tokyo, Dec., 2016.

Ide, S., Ebina, T., Richa, T. and Kuroda Y., Standalone definition of putatively independent structural domain: IS-Dom. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, Nov. 2016.

Yamada, M.K., Ebina, T. and Wada, Y. Visual-cued fear conditioning of mice and the change in the neuronal firing property in the visual cortex. Neuroscience 2015, Chicago, Oct. 2015

Tambi, R., Ide, S., Suzuki, R., Ebina, T. and Kuroda, Y. Accelerated H-DROP: An SVM based Helical Domain Linker predictor trained with Optimized features. The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Kanazawa, Sep. 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

蝦名 鉄平 (EBINA, Teppei)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
(旧所属)基礎生物学研究所・光脳回路研
究部門・NIBB リサーチフェロー
研究者番号：30611206

(2)研究分担者

特になし

(3)連携研究者

特になし

(4)研究協力者

特になし